

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



09/006232

PCT/JP 99/05349

29.09.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 22 NOV 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1998年 9月29日

出願番号  
Application Number:

平成10年特許願第276258号

出願人  
Applicant(s):

清水 元治

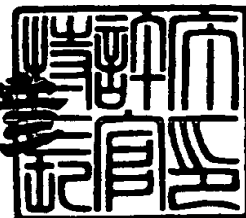
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月 5日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-307575

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 H10-1324N2  
 【提出日】 平成10年 9月29日  
 【あて先】 特許庁長官 殿  
 【国際特許分類】 C12N 15/00  
 【発明の名称】 新規ポリペプチドをコードするDNA  
 【請求項の数】 18  
 【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金台4-6-1

【氏名】 清木 元治

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都港区白金台4-6-1

【氏名又は名称】 清木 元治

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ポリペプチドをコードするDNA

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)、(b)、(c)または(d)のポリペプチド

- (a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (b) (a)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。
- (c) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。
- (d) (c)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

【請求項2】 請求項1記載のポリペプチドをコードするDNA。

【請求項3】 配列番号3の75～1928番または配列番号4の1～1935番に記載の塩基配列からなるDNAまたは該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項4】 請求項2または3に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

【請求項5】 請求項4記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

【請求項6】 形質転換体がEscherichia属に属する微生物である、請求項5記載の形質転換体。

【請求項7】 Escherichia属に属する微生物がEscherichia coliである、請求項6記載の形質転換体。

【請求項8】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポリペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【請求項 9】 請求項 2 または 3 記載の DNA の有する塩基配列中の連続した 5 ～ 60 塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるオリゴヌクレオチド。

【請求項 10】 請求項 9 記載のオリゴヌクレオチドを用いて請求項 1 記載のポリペプチドをコードする mRNA を検出する方法。

【請求項 11】 請求項 9 記載のオリゴヌクレオチドを用いて請求項 1 記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。

【請求項 12】 請求項 1 記載のポリペプチドおよび該ポリペプチドを発現する細胞を用いることを特徴とする、該ポリペプチドの阻害薬または活性化薬のスクリーニング法。

【請求項 13】 請求項 1 記載のポリペプチドを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

【請求項 14】 請求項 2 または 3 記載の DNA を含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

【請求項 15】 請求項 9 記載のオリゴヌクレオチドを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

【請求項 16】 請求項 2 または 3 の DNA、または請求項 9 記載のオリゴヌクレオチドをベクターに組み込んで得られる、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍のための遺伝子治療用ベクター。

【請求項 17】 請求項 1 記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、請求項 1 記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を調節する化合物のスクリーニング法。

【請求項 18】 遺伝子の発現を調節する化合物を、請求項 1 記載のポリペプチドをコードする mRNA 量を測定することにより検出することを特徴とする、請求項 17 記載のスクリーニング法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド、該ポリペプチドをコードする DNA、該 DNA を含むベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体および該ポリペプチドの製造方法に関する。更に、該ポリペプチドもしくはその一部又はそれらが発現した微生物もしくは動物細胞を利用した阻害薬または活性化薬を探索する方法および該ポリペプチドの遺伝子発現を調節する化合物を探索する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン等の複雑な成分から構成される細胞外マトリックスの分解には、金属イオンを活性中心に持つマトリックスメタロプロテアーゼと総称される一群の酵素（以下 MMPs と略記する）が関与している。

【0003】

これまでMMPsとしては、間質型コラゲナーゼ (MMP-1)、ゼラチナーゼA (MMP-2)、ゼラチナーゼB (MMP-9)、ストロメライシン1 (MMP-3)、マトリライシン (MMP-7)、好中球コラゲナーゼ (MMP-8)、ストロメライシン2 (MMP-10)、ストロメライシン3 (MMP-11)、メタロエラスターゼ (MMP-12)、コラゲナーゼ3 (MMP-13)、膜貫通型MMP-1 (MT1-MMPまたはMMP-14)、膜貫通型MMP-2 (MT2-MMPまたはMMP-15)、膜貫通型MMP-3 (MT3-MMPまたはMMP-16)、膜貫通型MMP-4 (MT4-MMPまたはMMP-17) 等が報告されている〔蛋白質核酸酵素, 42, 2386 (1997)〕。これらのMMPsはファミリーを形成し、各MMPは基本的にN-末端プロペプチドドメイン、亜鉛イオンが結合する活性ドメイン、ヘモペキシン凝血酵素様ドメインの3つから構成されている。MMP-7においてはヘモペキシン凝血酵素様ドメインはない。膜貫通型では、ヘモペキシン凝血酵素様ドメインのC-末端に膜貫通ドメインと、細胞内ドメインを持っている。

#### 【0004】

変形性関節症の患者においてMT1-MMPの産生が促進されていること〔Am. J. Pathol., 151, 245 (1997)〕、免疫や炎症反応に重要な白血球の組織への浸潤にMMPが重要なこと〔J. Immunol., 156, 1 (1996)〕、MMP阻害薬が肝炎を予防すること〔Eur. J. Pharmacol., 341, 105 (1998)〕、MMP阻害薬が角膜潰瘍の治療〔日本眼科学会誌, 102, 270 (1998)〕に有効であること等が知られている。

#### 【0005】

また、癌の増殖、浸潤、転移にMMPが重要であることが知られており〔蛋白質核酸酵素, 42, 2386 (1997)〕、MMP阻害薬が制癌活性をもつことが報告されている〔SCRIP, 2349, 20 (1998)〕。

更に、MT4-MMPは白血球に発現して、白血球の遊走と浸潤に関係があることが示唆されている。

#### 【0006】

以上のことから、MMPは変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫



疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の悪性度を診断する指標となるとともに、その阻害薬はこれらの疾患の予防と治療に用いることができる。

#### 【0007】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、生理的に活性を持ったヒトおよびマウスの新規膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチド〔以下、MT5-MMPと略す〕、該メタロプロテアーゼポリペプチドをコードするDNA、該メタロプロテアーゼポリペプチドの製造法および該メタロプロテアーゼポリペプチドおよびDNAを用いた阻害薬や活性化薬スクリーニング法等を提供する。

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、医薬用途として有用と考えられている既知の膜貫通型MMP以外にも、有用な新規膜貫通型MMPが存在するとの推測の基に鋭意検討を行い、本発明を完成するに至った。

#### 【0009】

すなわち、本発明は以下(1)～(18)に関する。

(1) 以下の(a)、(b)、(c)または(d)のポリペプチド。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(b) (a)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチド。

#### 【0010】

(c) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(d) (c)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつプロテア

ーゼ活性を有するポリペプチド。

【0011】

上記のアミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

かかる1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヌクレオシドのトランスポート活性を有するポリペプチドは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラークローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコルズ1~38と略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662 (1984)、Science, 224, 1431 (1984)、PCT W085/00817 (1985)、Nature, 316, 601 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

【0012】

(2) 上記(1)記載のポリペプチドをコードするDNA。

(3) 配列番号3の75~1928番または配列番号4の1~1935番に記載の塩基配列からなるDNAまたは該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【0013】

または該DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

上記において「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、配列番号3の75~1928番または配列番号4の1~1935番に記載の塩基配列からなるDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法

、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC (saline-sodium citrate) 溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

【0014】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラークローニング第2版、カレントプロトコルインモレキュラバイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)等の実験書に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0015】

ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、配列番号3の75～1928番または配列番号4の1～1935番に記載の塩基配列と少なくとも80%以上の相同性を有するDNA、好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

(4) 上記(2)または(3)に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

【0016】

(5) 上記(4)に記載の組換え体DNAを保有する形質転換体。

(6) 形質転換体がEscherichia属に属する微生物である、上記(5)記載の形質転換体。

(7) Escherichia属に属する微生物がEscherichia coliである、上記(6)記載の形質転換体。

【0017】

(8) 上記(1)に記載のポリペプチドをコードするDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAを保有する形質転換体を培養液中で培養し、該ポ

リペプチドを該培養物中に生成・蓄積させ、該培養物中より該ポリペプチドを採取することを特徴とする、該ポリペプチドの製造法。

【0018】

(9) 上記(2)または(3)記載のDNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するオリゴヌクレオチド、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド、およびこれらオリゴヌクレオチドの誘導体オリゴヌクレオチドから選ばれるオリゴヌクレオチド。

【0019】

(10) 上記(9)記載のオリゴヌクレオチドを用いて上記(1)記載のポリペプチドをコードするmRNAを検出する方法。

(11) 上記(9)記載のオリゴヌクレオチドを用いて上記(1)記載のポリペプチドの発現を抑制する方法。

【0020】

(12) 上記(1)記載のポリペプチドおよび該ポリペプチドを発現する細胞を用いることを特徴とする、該ポリペプチドの阻害薬または活性化薬のスクリーニング法。

(13) 上記(1)記載のポリペプチドを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

【0021】

(14) 上記(2)または(3)記載のDNAを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

【0022】

(15) 上記(9)記載のオリゴヌクレオチドを含有する変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍の診断薬、治療薬または予防薬。

【0023】

(16) 上記(2)または(3)のDNA、または上記(9)記載のオリゴヌクレオチドをベクターに組み込んで得られる、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植に伴う免疫反応、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、創傷、角膜潰瘍、組織傷害、白血球の浸潤に伴う炎症、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病または脳腫瘍のための遺伝子治療用ベクター。

【0024】

(17) 上記(1)記載のポリペプチドを発現する細胞と被験試料とを接触させることを特徴とする、上記(1)記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を調節する化合物のスクリーニング法。

(18) 遺伝子の発現を調節する化合物を、上記(1)記載のポリペプチドをコードするmRNA量を測定することにより検出することを特徴とする、上記(17)記載のスクリーニング法。

【0025】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

[1] 新規マトリックスメタロプロテアーゼMT5-MMPをコードするDNAの取得

(1) cDNAライブラリーの作製

cDNAライブラリーを作製するために、適切な細胞または組織より全RNA

あるいは mRNA を調製する。

【0026】

全 RNA を調製する方法として、チオシアン酸グアニジン・トリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymology, 154, 3 (1987)]、酸性グアニジンチオシアネート・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学 9, 1937 (1991)] 等を用いることができる。

【0027】

全 RNA からポリ (A) <sup>+</sup> RNA として mRNA を調製する方法として、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラークローニング第 2 版) やオリゴ dT ラテックスを用いる方法 [細胞光学 別冊 8 「新細胞光学実験プロトコール」 秀潤社 48-52 頁、Nucleic Acids Res., Symposium Series, 19, 61 (1988)] 等を用いることができる。

【0028】

ファースト・トラック・mRNA 単離キット [Fast Track mRNA Isolation Kit; インビトロジェン (Invitrogen) 社製]、クイック・プレップ・mRNA 精製キット [Quick Prep mRNA Purification Kit; ファルマシア (Pharmacia) 社製] 等のキットを用いて組織や細胞から直接 mRNA を調製することもできる。

【0029】

適切な細胞または組織として、脳や腎臓など組織、あるいは該組織由来の細胞株等を用いることが好ましい。

得られた全 RNA あるいは mRNA を用い、常法により cDNA ライブラリーを作製する。

【0030】

cDNA ライブラリー作製法として、モレキュラークローニング第 2 版やカレントプロトコールズインモレキュラーバイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995) 等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えばスーパースクリプト・プラスミド・システム・フォー・cDNA・シンセシス・アンド・プラスミド・クローニング [SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plas

mid Cloning; ギブコBRL (Gibco BRL) 社製] やザップー cDNA・シンセシス・キット [ZAP-cDNA Synthesis Kit、ストラタジーン社製] を用いる方法等をあげることができる。

#### 【0031】

cDNAライブラリーを作成するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。

具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda

ZAP II (ストラタジーン社製)、λgt10、λgt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、λTriplEx (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pCD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]、pAMo [J. Biol. Chem., 268, 22782-22787 (1993)、別名pAMoPRC3Sc (特開平05-336963)]等をあげることができる。

#### 【0032】

宿主微生物としては、大腸菌Escherichia coliに属する微生物であればいずれも用いることができる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [ストラタジーン社製、Strategies 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [Science, 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090-[Science, 222, 778-(1983)]、Escherichia coli NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、Escherichia coli JM105 [Gene, 38, 275 (1985)]、Escherichia coli SOLRTM Strain (ストラタジーン社製)、Escherichia coli LE392 (モレキュラークローニング第2版)等を用いることができる。

#### 【0033】

上記方法により作製した cDNAライブラリーに加え、市販の cDNAライブラリーも利用することができる。

市販の cDNA ライブラリーとして、クローンテック社、ライフテックオリエンタル社等のヒト、ウシ、マウス、ラット、ウサギ等由来の各臓器 cDNA ライブラリーをあげることができる。

【0034】

(2) 本発明の DNA の取得

上記 (1) で作製した cDNA ライブラリーより、本発明の DNA を有する cDNA クローンを、アイソトープあるいは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいはブラーク・ハイブリダイゼーション法 [モレキュラークロニング第 2 版] 等により選択することができる。

【0035】

プローブとしては、MT3-MMP をコードする DNA の塩基配列に基いたオリゴヌクレオチドを利用することができる。

上記方法により得られた、目的とするクローンより、上述の方法で mRNA を取得し、cDNA を合成する。

【0036】

該 cDNA の両端にアダプターを付加し、このアダプターの塩基配列と一部明らかにしている塩基配列に基づいたプライマーで PCR を行う 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) および 3'-RACE [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998 (1988)] により、プライマーに用いた配列よりも 5' 端側および 3' 端側の cDNA 断片を得ることができる。

【0037】

得られた cDNA 断片をつなぎあわせることにより全長の cDNA を取得することができる。

上記の方法により取得された DNA の塩基配列は、該 DNA 断片をそのままあるいは適当な制限酵素等で切断後常法によりベクターに組み込み、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] あるいはパーキン・エルマー社 (Perkin Elmer: 373A・DNA シークエンサー)、ファルマシア社、ライコア (LI-COR) 社等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより決定することができる。



## 【0038】

本発明のポリペプチドをコードするゲノム遺伝子の塩基配列を決定するためには、通常の染色体DNAクローン化法を用いることができる〔モレキュラークローニング第2版〕。

即ち、本発明のポリペプチドを発現している細胞、例えば脳や腎臓等の染色体DNAを制限酵素で消化し、該切断断片を通常のプラスミドベクターまたはファージベクターを用いてクローニングし、ゲノムライブラリーを作製する。

## 【0039】

上記において取得され、塩基配列の決定されたDNA断片をプローブとして用い、上記のcDNAクローニングで用いた方法と同様の方法で該ゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のポリペプチドをコードするゲノム遺伝子を有するクローンを取得することができる。

## 【0040】

該クローンを用いて、上述の方法によりゲノム遺伝子の塩基配列を決定することができる。

また、上記方法で取得したDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを選択することにより、他の組織あるいは、他の動物由来、例えばヒト由来の目的とするDNAを取得することができる。

## 【0041】

上記方法により得られた塩基配列情報に基づき、DNA合成機で化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。DNA合成機としては、チオホスファイト法を利用した島津製作所社製のDNA合成機、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社製のDNA合成機model 392等をあげることができる。

## 【0042】

得られた塩基配列の新規性に関しては、BLAST等の相同性検索プログラムを用いて、GenBank、EMBLおよびDDBJなどの塩基配列データベースを検索することにより確認することができる。新規な塩基配列については、アミノ酸配列に変換したのちFASTA、フレームサーチ (FrameSearch) などの相同性検索プログラムを用

いて、GenPept、PIR、Swiss-Protなどのアミノ酸配列データベースを検索することにより、相同性をもつ既存の遺伝子を検索することができる。

#### 【0043】

該方法により確認された新規な塩基配列を有する本発明のポリペプチドをコードするDNAとして、例えば、配列番号3または配列番号4で表される配列を有するDNA等をあげることができる。

配列番号3で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドとしてはpmMT5/pBSSKを、配列番号4で表される塩基配列からなるDNAを有するプラスミドとしてはphMT5/pGEMをあげることができる。

#### 【0044】

プラスミドpmMT5/pBSSKを含有する大腸菌Escherichia coli pmMT5/pBSSKは、FERM BP-6529として、プラスミドphMT5/pGEMを含有する大腸菌Escherichia coli phMT5/pGEMは、FERM BP-6531として平成10年9月25日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目3番（郵便番号305-0046）に寄託されている。

#### 【0045】

##### （3）本発明のオリゴヌクレオチドの調製

上述の方法で取得した本発明のDNAおよびDNA断片を用いて、常法あるいは上記記載のDNA合成機により、本発明のDNAの一部の配列を有するアンチセンス・オリゴヌクレオチド、センス・オリゴヌクレオチド等のオリゴヌクレオチドを調製することができる。

#### 【0046】

該オリゴヌクレオチドとしては、上記DNAの有する塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができ、具体的には、配列番号3または4で表される塩基配列中の連続した5～60塩基と同じ配列を有するDNAまたは該DNAと相補的な配列を有するDNAをあげることができる。センスプライマーおよびアンチセンスプライマーとして用いる場合には、両者の融解温度（ $T_m$ ）および塩基数が極端に変わることはない上記記載のオリゴヌクレオチドが好ましい。

## 【0047】

更に、これらオリゴヌクレオチドの誘導体も本発明のオリゴヌクレオチドとして利用することができる。

該誘導体オリゴヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がN 3' - P 5' ホスフォアミデート結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 プロピニルウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のウラシルがC-5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがC-5 プロピニルシトシンで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン (phenoxazine-modified cytosine) で置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のリボースが2' - O - プロピルリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが2' - メトキシエトキシリボースで置換された誘導体オリゴヌクレオチド等をあげることができる〔細胞工学, 16, 1463 (1997)〕。

## 【0048】

[2] 本発明のマトリックスメタロプロテアーゼMT5-MMPポリペプチドの調製

## (1) 形質転換体の作製

上記[1]に記載の方法により取得した本発明のDNAを宿主細胞中で発現させるためには、モレキュラークローニング第2版やカレント・プロトコルズ1〜38等に記載された方法を用いることができる。

## 【0049】

即ち、本発明のDNAを適当な発現ベクターのプロモーター下流に挿入した組換えベクターを作成し、それを宿主細胞に導入することにより、本発明のポリペプチドを発現する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

【0050】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なしは染色体中への組込が可能で、本発明のDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明のポリペプチド遺伝子発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0051】

発現ベクターとしては、例えば、pKK233-2（ファルマシア社製）、pSE280（インビトロジェン社製）、pGEMEX-1〔プロメガ(Promega)社製〕、pQE-8〔キアゲン(QIAGEN)社製〕、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)〕、pBluescript II SK(-)（ストラタジーン社製）、pGEX（ファルマシア社製）、pET-3（ノバジェン社製）等をあげることができる。

【0052】

プロモーターとしては、大腸菌や枯草菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター(Ptrp)、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、T7プロモーター等の大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター(Ptrp×2)、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0053】

リボソーム結合配列としては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであれ

ばいかなるものでもよいが、シャインーダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば 6 ~ 18 塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

#### 【0054】

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY 3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli H B101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli N Y49、Serratiaficaria、Serratiafonticola、Serratialiquefaciens、Serratiam arcescens、Bacillusubtilis、Bacillusamyloliquefaciens、Brevibacteriumammoniagenes、Brevibacteriumimmariophilum ATCC14068、Brevibacteriumsaccharolyticum ATCC14066、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14067、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacteriumammoniophilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110等をあげることができる。

#### 【0055】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へD-N-Aを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-2483942)、エレクトロポレーション法 [Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)] 等をあげることができる。

#### 【0056】

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YE p13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等

を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを  
用いてもよく、例えば、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター  
、ADHプロモーター、gal 1プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショック  
ポリペプチドプロモーター、MF $\alpha$ 1 プロモーター、CUP 1プロモーター等のプロ  
モーターをあげることができる。

【0057】

宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベ  
ロミセス属、トリコスポロン属、シワニオミセス属、ピヒア等に属する酵母菌株  
をあげることができ、具体的には、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharo  
myces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces  
alluvius、Pichiapastoris等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればい  
ずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enz  
ymology, 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. US  
A, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [Journal of Bacteriology, 153, 163 (1983)] 等をあげることができる。

【0058】

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、PAGE10  
7 [特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3 (特開平2-22707  
5)、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA I/Amp (インビトロジェン社  
製)、pREP4 (インビトロジェン社製)、PAGE103 [Journal of Biochemistry, 101,  
1307 (1987)] 等が用いられる。

【0059】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いる  
ことができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺  
伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロ  
モーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR  
 $\alpha$  プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハン

サーをプロモーターと共に用いてもよい。

#### 【0060】

動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、HEK293細胞 (ATCC: CRL-1573)、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平2-227075)、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)、Virology, 52, 456 (1973)] 等をあげることができる。

#### 【0061】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばBaculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、カレント・プロトコルズ1~38、Bio Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、ポリペプチドを発現することができる。

#### 【0062】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、ポリペプチドを発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製) 等をあげることができる。

#### 【0063】

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual (1992)]、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5 (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

【0064】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)〕等をあげることができる。

【0065】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラークローニング第2版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加されたポリペプチドを得ることができる。

【0066】

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

また、患者の生体内から採取した細胞に、本発明のMT5-MMPポリペプチドを発現する適切な発現ベクターを導入した後、細胞を生体内に戻すことにより、本発明のMT5-MMPポリペプチドを患者の生体内で発現させることもできる。

【0067】

（2）形質転換体の培養

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0068】

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラク



トース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

## 【0069】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

## 【0070】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16～96時間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

## 【0071】

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

## 【0072】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medical Association

n,199, 519 (1967))、EagleのMEM培地 [Science,122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine,73, 1 (1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

【0073】

培養は、通常pH6～8、30～40℃、5%CO<sub>2</sub>存在下等の条件下で1～7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0074】

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 [ファーミンジェン (Pharmingen) 社製]、Sf-900 II SFM培地 (ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell1400、ExCell1405 [いずれもJRH バイオサイエンス (JRH Biosciences) 社製]、Grace's Insect Medium [Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

【0075】

培養は、通常pH6～7、25～30℃等の条件下で1～5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

(3) 発現させたポリペプチドの単離精製

上記形質転換体の培養液から、上記方法により発現させたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。例えば、本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、Q-セファロース、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマト

グラフィー法、S-Sepharose FF（ファルマシア社製）等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

## 【0076】

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該ポリペプチドを回収後、該ポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該ポリペプチドを正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

## 【0077】

本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチドあるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。本発明のポリペプチドあるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞上に発現された場合には、培養細胞の膜画分を界面活性剤で溶解して可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

## 【0078】

また、本発明のポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（t-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンスド・ケムテック（Advanced ChemTech）社、パーキン・エルマー社、ファルマシア社、プロテイン・テクノロジー・インストゥルメント（Protein Technology Instrument）社、シンセセル・ベガ（Syn

thecell-Vega) 社、パーセプティブ (PerSeptive) 社、島津製作所等のペプチド合成機を利用し化学合成することもできる。

【0079】

〔3〕本発明のポリペプチドの生物活性の検出

上記〔2〕に記載の方法により取得した本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性は、ペプチドまたは蛋白質の分解物を電気泳動またはカラムクロマトグラフィーを用いて測定するか、または蛍光標識あるいはアイソトープ標識したペプチドまたは蛋白質の分解で測定する。ペプチドが切断されることで活性化される酵素の活性化状態を測定することでも検出可能である。ゼラチンザイモグラフィーに用いられるのと同様に、該酵素によって分解されるペプチドを含むゲルを用いても測定できる。

【0080】

〔4〕本発明のポリペプチドの阻害薬または活性化薬の探索および同定

本発明のポリペプチドMT5-MMPについて〔2〕記載の方法でMT5-MMPを発現させた細胞、〔2〕記載の方法で調製したMT5-MMP発現大腸菌から〔2〕に記載した方法で精製したMT5-MMPに被験試料を添加する。

【0081】

被験試料の添加の有無における、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性を比較することにより、被験試料の中からプロテアーゼ活性を増強する物質（活性化薬）および阻害する物質（阻害薬）をスクリーニングすることができる。

被験試料としては、合成化合物、天然に存在する蛋白質、人工的に合成された蛋白質、ペプチド、糖質、脂質、これらの修飾体、誘導体を、また哺乳動物（例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、ヒト等）の尿、体液、組織抽出物、細胞培養上清、細胞抽出物を、更に、非ペプチド性化合物、発酵生産物、植物その他の生物の抽出物等をおこなうことができる。

【0082】

被験試料としてペプチドを用いる場合、ランダムペプチドライブラリーを利用することができる。ランダムペプチドライブラリーとしては、ファージ上のペプ

チドシステム (peptides on phage) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6378 (1990); PCT特許出願番号96/40189]、プラスミド上のペプチドシステム (peptides on plasmids) (米国出願特許番号5,270,170;米国出願特許番号5,338,665) があげられる。

#### 【5】本発明のDNA、ポリペプチドの利用

(1) 本発明のDNAは、これをプローブとして用いて、ヒトの組織やヒト由来の細胞から〔1〕(2)と同様にして抽出したRNAについてノーザンハイブリダイゼーションを行うことにより、その組織や細胞における本発明のポリペプチド遺伝子のmRNAを検出あるいは定量することができる。各種の組織でそのmRNAの発現量を比較することにより本発明のポリペプチドの組織発現分布を知ることができる。

#### 【0083】

また、本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のDNAの特異的プライマーとして用いて、ヒトの組織やヒト由来の細胞から〔1〕(2)と同様にして抽出したRNAについてRT-PCR [reverse transcription PCR; PCR Protocols (1990)]を行うことによってもmRNAの検出や定量を行うことができる。これらの該ポリペプチドmRNA定量法は本遺伝子が関与する病態の診断に用いることができる。

#### 【0084】

各種病態モデル動物における該ポリペプチドmRNAを定量することにより、病態における該遺伝子産物の重要性を明らかにすることができる。また、薬剤の有無による該ポリペプチドmRNAの発現量を比較することにより薬剤を評価することができる。

(2) 本発明のDNAあるいは該DNAの一部の塩基配列と同じ塩基配列または相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドは、これをプローブとして用いて、ヒトの組織切片に対してinsituハイブリダイゼーション [Methods in Enzymology, 254, 419 (1995)]を行うことにより、組織内での本発明のポリペプチドの発現細胞の特定等のより細かい発現分布を知ることができる。

#### 【0085】

これらの方法によって得られる、本発明のポリペプチドがどのような組織や細胞で発現しているかという情報や、細胞がどのような刺激を受けたときに発現量が変化するかという情報は、本発明のポリペプチドの生理機能や病態への関与を解析するのに役立つ。

(3) 本発明のDNAをプローブとして、ゲノムDNAに対してサザンハイブリダイゼーション(モレキュラークロニング第2版)を行うことにより、本発明のポリペプチドMT5-MMPをコードする遺伝子の変異を検出することができる。変異の検出を行うことにより、該遺伝子の変異が原因となっている可能性のある例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病、脳腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症などの疾患の診断を行うことができる。

#### 【0086】

(4) 本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチド(RNA/DNA)は、MT5-MMP遺伝子の転写もしくはmRNAの翻訳を抑制することにより〔化学46, 681 (1991)、Bio Technology, 9, 358 (1992)〕、該遺伝子が発症に関与している可能性のある、例えば、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植、肝炎、腎炎、膵炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病、脳腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症の治療あるいは予防などへの応用も期待される。

#### 【0087】

上述のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは、本発明のMT5-MMPポリペプチドをコードするDNAの一部の塩基配列、好ましくは翻訳開始領域にある10～50塩基と相補的な塩基配列を基にして設計・調製し、生体内に投与する。

本発明のDNAを含有する医薬は、本発明のポリペプチドに代えて本発明のDNAを用いる以外は、下記に示した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様な方法を用いて調製または投与される。

## 【0088】

(5) 本発明のDNAを用い、[2]記載の方法により本発明のポリペプチドを取得することができる。

本発明のポリペプチドの用途としては、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植、肝炎、腎炎、脾炎、動脈硬化、白血病、悪性腫瘍、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病、脳腫瘍、白血球浸潤に伴う炎症などの診断薬、治療薬または予防薬が考えられる。

## 【0089】

本発明のポリペプチドを含有する医薬は、診断薬または治療薬として該ポリペプチド単独で投与することも可能ではあるが、通常は該ポリペプチドを薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、貯蔵のため凍結乾燥し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

## 【0090】

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、通常は非経口経路、例えば皮下、筋肉内、静脈内、気道内等の投与経路が用いられる。

(6) 本発明のDNA（センスDNAまたはアンチセンスDNA）またはこれらの塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドは一本鎖または二本鎖としてレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルスベクター、その他のベクターに組み込んで遺伝子治療用ベクターとし、遺伝子治療に用いることができる。

## 【0091】

## 【実施例】

以下により具体的な実施例をあげて説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

【0092】

実施例1 マウスMT5-MMP遺伝子のクローニング

マウスMT3-MMP遺伝子を単離するために、マウス17日胚の脳cDNAライブラリーをZAP-cDNA Synthesis Kit(Stratagene)を用い、該キットに添付のマニュアルに従って作成した。

【0093】

ヒトMT3-MMP遺伝子をプローブとして上記cDNAライブラリーのスクリーニングをブランクハイブリダイゼーション法により行った。強いシグナルと弱いシグナルを示すブランクが得られたため、それらのクローンの塩基配列を決定した。

弱いシグナルを示すクローンを解析した結果、その中の一つの2.1kbの配列はヒトならびにラットMT3-MMPと弱い相同性を示すが、他のMMPとも相同性が大幅に異なることから、新規のMMP遺伝子であると考えられた。

【0094】

続いて、上記ライブラリーからブランクハイブリダイゼーション法により2.1kbの配列とハイブリダイズする3.7kbのcDNAを取得した。2.1kbと3.7kbの配列から、配列番号3に示す4.2kbのcDNA配列が得られた。

配列番号3に示すcDNAは配列番号1で表される618アミノ酸の蛋白質がコードされていた。配列番号1のペプチドはMT-MMPの各ドメインに相当する配列をよく保存された状態で持っていることから、新規のMT-MMP、即ち、マウスMT5-MMPであると結論された(図1)。

【0095】

実施例2 ヒトMT5-MMP遺伝子のクローニング

マウスMT5-MMPに対応するヒト遺伝子を確認する為に、マウスMT5-MMP遺伝子をプローブとしてヒト腎臓cDNAライブラリー(クロンテック社製)のスクリーニングを上記実施例1と同様の方法でブランクハイブリダイゼー



ションを行い、マウスMT5-MMPと92%の相同性を有し、既知のMT-MMPとは異なる遺伝子を得た。

【0096】

解析したヒトMT5-MMPのcDNAクローンは全て、シグナルペプチドをコードするはずの5'領域を欠いていたため、以下に示す5'RACE法によって欠損部分の配列を決定し、ヒトMT5-MMPをコードする全領域を含む遺伝子配列を決定した。

cDNAはsuperscript II (ギブコBRL)を使用して、ヒト脳の poly(A)+ RNA (クロンテック社製) とヒトMT5-MMP選択的なプライマー(配列番号5)を用いて、該キットに添付のマニュアルに従って作成した。

【0097】

得られたcDNAに単一鎖のオリゴヌクレオチドアダプター(配列番号6)をT4RNAリガーゼでつなぎ、MT5-MMP選択的なプライマー(配列番号5)とアダプター選択的なプライマー(配列番号7)でGC緩衝液とLATAq (宝酒造社製)を用いてPCRを行った。

【0098】

PCR後、遺伝子選択的な他のプライマー(配列番号8)とアダプター選択的なプライマー(配列番号9)を用いてPCRを行った。マウス遺伝子をプローブとしてヒト腎臓cDNAライブラリーから得られた配列と5'RACE法によって得られた配列から、配列番号2の645アミノ酸の蛋白質をコードする配列番号4の2.6kbのcDNAが取得できた。

【0099】

実施例3 MT5-MMPのmRNAの臓器での発現

組織におけるMT5-MMP遺伝子発現をノーザン・ブロッティングで調べた。

即ち、20 $\mu$ gの全RNAを1%アガロースゲルで泳動しナイロンメンブレンに転写し、<sup>32</sup>Pで標識したマウスMT5-MMP遺伝子をプローブに用いてノーザンブロッティングを行い、約4kbのMT5-MMPのmRNAの発現パターンを調べた。

## 【0100】

2週齢のマウスでは、発現は脳にのみ強いシグナルが観察され、他の臓器の組織では脳に比べて検出限界かそれ以下の低い発現しか認められなかった。

ヒトの組織での発現をヒトMT5-MMP遺伝子をプローブに用いてmultiple tissue blot (クロンテック社製) を行って調べたところ、脳に高発現であった。<sup>32</sup>Pで標識したMT5-MMP遺伝子をプローブに用いてノーザンブロッティングを行い、ヒト脳でも4.0 kbと4.8 kbのMT5-MMPのmRNAの強い発現が認められた。ヒトではそれ以外に腎臓と脾臓で発現が認められた。脳では4.8 kbのmRNAが、腎臓と脾臓では4.0 kbのmRNAが強く発現していた。

## 【0101】

MT5-MMP特異的なプライマー（配列番号10および11）を用いた、RT-PCRによる解析では腎臓、脾臓ともに脳と同じサイズのDNA断片が同程度の効率で増幅し、サイズの異なるプロダクトが見られないことから、短い転写産物も完全なコーディング領域を持つと考えられる。

## 【0102】

MT5-MMPの発現をマウス及びヒトで調べると特徴的な発現が脳に見られた。特にマウスで見る限り、発現は脳に限局しており、他の臓器での発現は非常に低かった。

脳の発現に特徴があることから、脳の組織別ブロット (human brain multiple tissue blot: クロンテック社製) を用い、部位特異的発現を調べた。

## 【0103】

MT5-MMPの発現は小脳に高い発現が見られる他、大脳皮質、髄質、後頭部、前頭部、側頭部、被殻での発現が認められたが、脊髄での発現は見られなかった。

この結果は、他のMT-MMPが様々な組織で発現するのとは異なる、MT5-MMP特有の際だった特徴を示している。

## 【0104】

ヒトでも、脳の発現は強く、それ以外にも腎臓及び脾臓での発現が見られた。

ヒト脳の部位特異的な発現を調べると、小脳での高発現が特徴的であった。小脳での高発現はマウスでも確認された。

この結果は、MT5-MMPは脳組織の形成と維持、神経回路構築などの過程に伴う細胞周辺の細胞外基質分解を制御している可能性を示している。

【0105】

#### 実施例4 MT5-MMPのmRNAの癌細胞での発現

MT1-MMPは多くの癌組織で、癌細胞自身及び周辺の間質細胞で高頻度に発現しており、ゼラチナーゼAの組織レベルでの活性化因子として働いている。様々な癌細胞株における発現をMT5-MMP特異的なプライマー（配列番号10および11）を用いて、RT-PCRで調べた。

結果を第1表に示した。

【0106】

【表 1】

第 1 表 MT 5-MMP 転写産物の癌細胞での発現

癌細胞株	MT5-MMP	寄託番号
Jurkat (T cell)	-	ATCC TIB-152
Raji(B cell)	-	ATCC CCL-86
BJAB(B cell)	-	ATCC HB-136
THP-1(monocytic)	-	ATCC TIB-202
K562(monocytic)	-	ATCC CCL-243
U-937(monocytic)	-	ATCC CRL-1593.2
U-251 MG(astrocytoma)	-	発酵研 IF050288
SK-N-SH(neuroblastoma)	+++	ATCC HTB-11
no.10(glioma)	++	発酵研 IF050368
KALS-1(glioma)	+++	発酵研 IF050434
MKN-7(gastric)	+	理化研 RCB0999
MKN-28(gastric)	-	理化研 RCB1000
NUGC-4(gastric)	+	HS財団 JCRB0834
PANC-1(pancreatic)	+	ATCC CRL-1469
MIA PaCa-2(pancreatic)	+	ATCC CRL-1420
SK-HEP-1(hepatoma)	+	ATCC HTB-52
Hep 3B(hepatoma)	+	ATCC HB-8064
ZR-75-1(breast)	?	ATCC CRL-1500
MCF7(adenocarcinoma)	-	ATCC HTB-22
T-24(bladder)	-	ATCC HTB-4
A375(melanoma)	+/-	ATCC CRL-1619
HT-1080(fibrosarcoma)	+/-	ATCC CCL-121

+++ : 非常に強発現、++ : 強発現、+ : 中程度の発現、+/- : 少量発現、- : 発現無し

ATCC : American Type Culture Collection

HS 財団 : 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

理化研 : 特殊法人理化学研究所

発酵研 : 財団法人発酵研究所

MT 1-MMP が様々な癌細胞株で発現しているのに対して、MT 5-MMP の発現細胞は限られていたが、脳での発現に一致して神経系由来の神経芽細胞腫 [SK-N-SH (HTB-11, ATCC)]、未分化型グリオーマ [no.10 (IF050368, 発酵研究所)]、グリオーマ [KALS-1 (IF050434, 発酵研究所)] で高い発現が見られた。

【0107】

また、膵臓癌 [PANC-1 (CRL-1469, ATCC), MIA PaCa-2 (CRL-1420, ATCC)]

、肝癌〔SK-HEP-1 (HTB-52, ATCC) , Hep 3B (HB-8064, ATCC) 〕での発現が特徴的であった。

MT-MMP の細胞表面での異常発現は細胞の浸潤性を亢進させることが考えられる。実際にMT 1-MMP の過剰発現は癌細胞株の浸潤能を亢進させ、実験的転移を高発させる。ヒト癌組織では癌細胞や周辺の線維芽細胞がMT 1-MMP を高頻度で発現しており、MT 1-MMP が発現場所で活性化させるゼラチナーゼAの存在は癌の浸潤・転移とよく相関する。

#### 【0108】

未分化型グリオーマ、グリオーマ、脾臓癌、肝がんの細胞株で発現が見られることから、特定のタイプの癌ではMT 5-MMP の過剰発現が癌細胞の悪性性質に関与している可能性が示唆された。

#### 【0109】

##### 【発明の効果】

本発明により得られる新規MT 5-MMP ポリペプチドのDNAを用いることにより、変形性関節症、慢性関節リウマチ、喘息、自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、乾癬、接触性皮膚炎、脱毛症、虚血性心疾患、臓器移植、肝炎、腎炎、脾炎または動脈硬化などの白血球の浸潤を伴う炎症、角膜潰瘍を含む創傷、白血病、脳卒中時の脳障害、アルツハイマー病、痴呆症、多発性硬化症、パーキンソン病、脳腫瘍、癌などの疾患の診断、予防、治療が可能となる。

#### 【0110】

##### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Seiki Motoji

<120> DNA CODING FOR NOVEL POLIPEPTIDE

<130> H10-1324N2

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 618

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly Gln Ala Ser Arg  
1 5 10 15

Trp Ser Gly Trp Arg Ala Pro Gly Arg Leu Leu Pro Leu Leu Pro Ala  
20 25 30

Leu Cys Cys Leu Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Lys Pro Ala Gly Ala  
35 40 45

Asp Ala Pro Phe Ala Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser Tyr Gly Tyr Leu  
50 55 60

Leu Pro Tyr Glu Ser Arg Ala Ser Ala Leu His Ser Gly Lys Ala Leu  
65 70 75 80

Gln Ser Ala Val Ser Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly Ile Pro Val Thr

85

90

95

Gly Val Leu Asp Gln Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys Lys Pro Arg Cys

100

105

110

Gly Val Pro Asp His Pro His Leu Ser Arg Arg Arg Arg Asn Lys Arg

115

120

125

Tyr Ala Leu Thr Gly Gln Lys Trp Arg Gln Lys His Ile Thr Tyr Ser

130

135

140

Ile His Asn Tyr Thr Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp Thr Arg Lys Ala

145

150

155

160

Ile Arg Gln Ala Phe Asp Val Trp Gln Lys Val Thr Pro Leu Thr Phe

165

170

175

Glu Glu Val Pro Tyr His Glu Ile Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ala Asp

180

185

190

Ile Met Ile Phe Phe Ala Ser Gly Phe His Gly Asp Ser Ser Pro Phe

195

200

205

Asp Gly Glu Gly Gly Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Gly

210

215

220

Ile Gly Gly Asp Thr His Phe Asp Ser Asp Glu Pro Trp Thr Leu Gly

225

230

235

240

Asn Ala Asn His Asp Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val Ala Val His Glu  
245 250 255

Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Asn Asp Pro Ser Ala Ile  
260 265 270

Met Ala Pro Phe Tyr Gln Tyr Met Glu Thr His Asn Phe Lys Leu Pro  
275 280 285

Gln Asp Asp Leu Gln Gly Ile Gln Lys Ile Tyr Gly Pro Pro Ala Glu  
290 295 300

Pro Leu Glu Pro Thr Arg Pro Leu His Thr Leu Pro Val Arg Arg Ile  
305 310 315 320

His Ser Pro Ser Glu Arg Lys His Glu Arg His Pro Arg Pro Pro Arg  
325 330 335

Pro Pro Leu Gly Asp Arg Pro Ser Thr Pro Gly Ala Lys Pro Asn Ile  
340 345 350

~~Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly Glu Met Phe~~  
355 360 365

Val Phe Lys Asp Arg Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn Arg Val Gln  
370 375 380

Glu Gly Tyr Pro Met Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys Gly Leu Pro Ala  
385 390 395 400



Arg Ile Asp Ala Ala Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg Phe Val Phe Phe  
405 410 415

Lys Gly Asp Lys Tyr Trp Val Phe Lys Glu Val Thr Val Glu Pro Gly  
420 425 430

Tyr Pro His Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu Pro Arg Glu Gly  
435 440 445

Ile Asp Thr Ala Leu Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys Thr Tyr Phe Phe  
450 455 460

Lys Gly Glu Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg Arg Ala Thr Asp  
465 470 475 480

Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile Pro Gln Ala  
485 490 495

Pro Gln Gly Ala Phe Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr Thr Tyr Phe Tyr  
500 505 510

Lys Gly Arg Asp Tyr Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys Leu Ser Val Glu  
515 520 525

Pro Gly Tyr Pro Arg Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Lys Gln  
530 535 540

Lys Glu Val Glu Arg Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro Gln Asp Asp Val

545

550

555

560

Asp Ile Met Val Thr Ile Asp Asp Val Pro Gly Ser Val Asn Ala Val

565

570

575

Ala Val Val Val Pro Cys Thr Leu Ser Leu Cys Leu Leu Val Leu Leu

580

585

590

Tyr Thr Ile Phe Gln Phe Lys Asn Lys Ala Gly Pro Gln Pro Val Thr

595

600

605

Tyr Tyr Lys Arg Pro Val Gln Glu Trp Val

610

615

<210> 2

<211> 645

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly Pro Pro Pro Pro

1

5

10

15

Pro Pro Pro Pro Gly Gln Ala Pro Arg Trp Ser Arg Trp Arg Val Pro

20

25

30

Gly Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ala Leu Cys Cys Leu Pro Gly

35

40

45

Ala Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Asn Arg Ala Ala  
50 55 60

Val Ala Val Ala Val Ala Arg Ala Asp Glu Ala Glu Ala Pro Phe Ala  
65 70 75 80

Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser Tyr Gly Tyr Leu Leu Pro Tyr Asp Ser  
85 90 95

Arg Ala Ser Ala Leu His Ser Ala Lys Ala Leu Gln Ser Ala Val Ser  
100 105 110

Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly Ile Pro Val Thr Gly Val Leu Asp Gln  
115 120 125

Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp His  
130 135 140

Pro His Leu Ser Arg Arg Arg Arg Asn Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly  
145 150 155 160

~~Gln Lys Trp Arg Gln Lys His Ile Thr Tyr Ser Ile His Asn Tyr Thr~~  
165 170 175

Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp Thr Arg Lys Ala Ile Arg Gln Ala Phe  
180 185 190

Asp Val Trp Gln Lys Val Thr Pro Leu Thr Phe Glu Glu Val Pro Tyr  
195 200 205

His Glu Ile Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ala Asp Ile Met Ile Phe Phe

210

215

220

Ala Ser Gly Phe His Gly Asp Ser Ser Pro Phe Asp Gly Glu Gly Gly

225

230

235

240

Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Thr

245

250

255

His Phe Asp Ser Asp Glu Pro Trp Thr Leu Gly Asn Ala Asn His Asp

260

265

270

Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu

275

280

285

Gly Leu Glu His Ser Ser Asp Pro Ser Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr

290

295

300

Gln Tyr Met Glu Thr His Asn Phe Lys Leu Pro Gln Asp Asp Leu Gln

305

310

315

320

Gly Ile Gln Lys Ile Tyr Gly Pro Pro Ala Glu Pro Leu Glu Pro Thr

325

330

335

Arg Pro Leu Pro Thr Leu Pro Val Arg Arg Ile His Ser Pro Ser Glu

340

345

350

Arg Lys His Glu Arg Gln Pro Arg Pro Pro Arg Pro Pro Leu Gly Asp

355

360

365

Arg Pro Ser Thr Pro Gly Thr Lys Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe

370

375

380

Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg

385

390

395

400

Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn Arg Val Gln Glu Gly Tyr Pro Met

405

410

415

Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys Gly Leu Pro Ala Arg Ile Asp Ala Ala

420

425

430

Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg Phe Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys Tyr

435

440

445

Trp Val Phe Lys Glu Val Thr Val Glu Pro Gly Tyr Pro His Ser Leu

450

455

460

Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu Pro Arg Glu Gly Ile Asp Thr Ala Leu

465

470

475

480

Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Tyr

485

490

495

Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg Arg Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Lys

500

505

510

Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile Pro Gln Ala Pro Gln Gly Ala Phe  
515 520 525

Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr Thr Tyr Phe Tyr Lys Gly Arg Asp Tyr  
530 535 540

Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys Leu Ser Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg  
545 550 555 560

Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Asn Gln Lys Glu Val Glu Arg  
565 570 575

Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro Gln Asp Asp Val Asp Ile Met Val Thr  
580 585 590

Ile Asn Asp Val Pro Gly Ser Val Asn Ala Val Ala Val Val Ile Pro  
595 600 605

Cys Ile Leu Ser Leu Cys Ile Leu Val Leu Val Tyr Thr Ile Phe Gln  
610 615 620

Phe Lys Asn Lys Thr Gly Pro Gln Pro Val Thr Tyr Tyr Lys Arg Pro  
625 630 635 640

Val Gln Glu Trp Val  
645

<210> 3

<211> 4263

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (75)..(1928)

<400> 3

gcgggaggac ccggccggag ccgccgccgc cgccgccgcc atcgagccg ggcggccggg 60

ccccgccgc cggg atg ccg agg agc cgg ggc ggc cgc gct gcg ccg ggc 110

Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly

1

5

10

cag gcc tcg cgc tgg agc ggc tgg cgg gcc ccg ggg cgg ctg ctg ccg 158

Gln Ala Ser Arg Trp Ser Gly Trp Arg Ala Pro Gly Arg Leu Leu Pro

15

20

25

ctg ctg ccc gcg ctc tgc tgc ctc gcg gcg gcg gcg ggg gcc ggg aag 206

Leu Leu Pro Ala Leu Cys Cys Leu Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Lys

30

35

40

ccg gcc ggg gcg gac gcg ccc ttc gct ggg cag aac tgg tta aaa tca 254

Pro Ala Gly Ala Asp Ala Pro Phe Ala Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser

45

50

55

60

tat ggc tat ctg ctt ccc tat gag tcg cgg gca tct gcg ttg cat tct 302

Tyr Gly Tyr Leu Leu Pro Tyr Glu Ser Arg Ala Ser Ala Leu His Ser

65

70

75

ggg aag gcc ttg cag tcc gcg gtc tcc act atg cag cag ttt tac ggg 350

Gly Lys Ala Leu Gln Ser Ala Val Ser Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly

80

85

90

atc cca gtc acc ggt gtg ttg gat cag aca aca atc gag tgg atg aag 398

Ile Pro Val Thr Gly Val Leu Asp Gln Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys

95

100

105

aaa cct cga tgt ggc gtc cct gat cat ccc cac ttg agc agg agg agg 446

Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp His Pro His Leu Ser Arg Arg Arg

110

115

120

aga aat aag cga tat gcc cta act gga cag aag tgg agg cag aaa cac 494

Arg Asn Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly Gln Lys Trp Arg Gln Lys His

125

130

135

140

atc acc tac agc att cac aat tat acc cca aag gtg ggt gag ctg gac 542

Ile Thr Tyr Ser Ile His Asn Tyr Thr Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp

145

150

155

~~aca cgg aag gct att cgt cag gct ttc gat gtg tgg cag aag gtg act~~ 590

Thr Arg Lys Ala Ile Arg Gln Ala Phe Asp Val Trp Gln Lys Val Thr

160

165

170

cca ctg acc ttt gaa gag gtg cca tac cat gag atc aaa agt gac cgg 638

Pro Leu Thr Phe Glu Glu Val Pro Tyr His Glu Ile Lys Ser Asp Arg

175

180

185



aag gag gca gac atc atg atc ttc ttt gct tct ggt ttc cat ggt gac 686  
Lys Glu Ala Asp Ile Met Ile Phe Phe Ala Ser Gly Phe His Gly Asp

190

195

200

agc tcc cca ttt gat ggg gaa ggg gga ttc cta gcc cat gcc tac ttt 734  
Ser Ser Pro Phe Asp Gly Glu Gly Gly Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe

205

210

215

220

cct ggc cca ggg atc gga gga gac act cac ttt gat tca gat gaa ccc 782  
Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Thr His Phe Asp Ser Asp Glu Pro

225

230

235

tgg acg cta gga aat gcc aac cat gat ggc aat gac ctc ttc ctg gtg 830  
Trp Thr Leu Gly Asn Ala Asn His Asp Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val

240

245

250

gcc gtg cat gaa ctg ggc cat gca ctg ggc ttg gag cac tct aat gac 878  
Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu Gly Leu Glu His Ser Asn Asp

255

260

265

ccc agt gct atc atg gct ccc ttc tac caa tac atg gag aca cac aac 926  
~~Pro Ser Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr Gln Tyr Met Glu Thr His Asn~~

270

275

280

ttc aag cta ccg cag gac gat ctc cag ggc atc cag aag att tac gga 974  
Phe Lys Leu Pro Gln Asp Asp Leu Gln Gly Ile Gln Lys Ile Tyr Gly

285

290

295

300

ccc cca gct gag cct ctg gag ccc aca agg ccc ctc cat aca ctc ccg 1022

Pro Pro Ala Glu Pro Leu Glu Pro Thr Arg Pro Leu His Thr Leu Pro

305

310

315

gtc cgc agg atc cac tcg ccg tct gag agg aag cac gag cgg cac cca 1070

Val Arg Arg Ile His Ser Pro Ser Glu Arg Lys His Glu Arg His Pro

320

325

330

agg ccc cca cgg ccg ccc ctt ggg gac cgg cca tcc act cca ggt gcc 1118

Arg Pro Pro Arg Pro Pro Leu Gly Asp Arg Pro Ser Thr Pro Gly Ala

335

340

345

aaa ccc aac atc tgc gat ggc aac ttc aac aca gtg gcc ctc ttc cga 1166

Lys Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg

350

355

360

ggg gag atg ttt gtg ttc aag gat cgc tgg ttc tgg cgc ctg cgc aat 1214

Gly Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn

365

370

375

380

aac cgg gtg cag gaa ggc tac ccc atg cag atc gaa cag ttc tgg aag 1262

Asn Arg Val Gln Glu Gly Tyr Pro Met Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys

385

390

395

ggc ctg ccc gcc cgc ata gac gca gcc tat gaa aga gct gac ggg aga 1310

Gly Leu Pro Ala Arg Ile Asp Ala Ala Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg

400

405

410

ttc gtc ttc ttc aaa gga gac aag tac tgg gtt ttc aaa gaa gtg acg 1358

Phe Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys Tyr Trp Val Phe Lys Glu Val Thr

415

420

425

gtg gaa cct ggg tac ccc cac agc ttg ggg gag ctg gga agc tgc ctg 1406

Val Glu Pro Gly Tyr Pro His Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu

430

435

440

ccc cgt gaa gga att gac aca gct ctg cgc tgg gaa cct gtg ggc aaa 1454

Pro Arg Glu Gly Ile Asp Thr Ala Leu Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys

445

450

455

460

acc tac ttc ttc aaa ggc gaa cgg tac tgg cgc tac agc gag gag cgg 1502

Thr Tyr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Tyr Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg

465

470

475

cga gcc aca gac cct ggc tac ccc aag ccc atc acc gtg tgg aag ggc 1550

Arg Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly

480

485

490

atc ccg cag gct ccg caa ggg gcc ttc atc agc aag gaa gga tat tac 1598

Ile Pro Gln Ala Pro Gln Gly Ala Phe Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr

495

500

505

acc tac ttc tac aaa ggc cgg gac tac tgg aag ttt gac aac cag aaa 1646

Thr Tyr Phe Tyr Lys Gly Arg Asp Tyr Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys

510

515

520

ctg agc gtg gag cca ggc tac cca cgc aac atc ctg cgt gac tgg atg 1694

Leu Ser Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met

525

530

535

540

ggc tgc aag cag aag gag gta gag cgg cgt aag gag cgg agg ctg ccc 1742

Gly Cys Lys Gln Lys Glu Val Glu Arg Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro

545

550

555

cag gat gat gtg gac atc atg gtg acc atc gat gac gtg cca ggc tct 1790

Gln Asp Asp Val Asp Ile Met Val Thr Ile Asp Asp Val Pro Gly Ser

560

565

570

gtg aac gct gtg gct gtg gtt gtc ccc tgc aca ctg tcc ctc tgc ctc 1838

Val Asn Ala Val Ala Val Val Val Pro Cys Thr Leu Ser Leu Cys Leu

575

580

585

ctg gtg ctg ctc tac act atc ttc caa ttc aag aac aag gcg ggt cct 1886

Leu Val Leu Leu Tyr Thr Ile Phe Gln Phe Lys Asn Lys Ala Gly Pro

590

595

600

cag ccc gtc acc tac tat aag cgg ccg gtc cag gag tgg gta 1928

Gln Pro Val Thr Tyr Tyr Lys Arg Pro Val Gln Glu Trp Val

605

610

615

~~tgagcagccc agagccctct ctgtctaccc ggtctggcca gccaggccct tcctcaccag~~ 1988

ggtctgaggg gcagctctag ccactgccca ctggggccag cagggctaag gcagggttcg 2048

tgtgtagctg aagtgggtggg tgcactgggc taggctgagt gcggggctgg gattgatggt 2108

ggctatgccc aggttgggta gctggcaccc agctgccagc cttctgtcct gggcagacct 2168

ctctctactc aagggaatag gccaggccct gtcaggagtc aaggatggtg ccaggaggtg 2228

cccctgaggt cattgcatcc tgttggtgtct gcaagatacc acagctccag tccctggctgg 2288

gaccagccc tctgaggcaa gccagcacta gctctcacc caccccaaga tgccaccaat 2348

cccagtcctc tctgccaaca cctgctggtc agatgtcccc tcatccctac cctactatcc 2408

tccaaggctg cagtgcctct gatgccaaca gagtgggcaa aagcctgggt tccccctgct 2468

agcccataga gagattcctc aggaaacctg ticcaccctg caggtctcct ctgagactca 2528

gaacttaggg tcacatgctg caggcaaggc tgtggccagc tggatctcac aaggaccag 2588

ctgtcatgtc gtgaatattt aaatgtcctg tcaactactgt ttaaagtccc attttgcaaa 2648

ggctacttga ggctttaggt cagctagagg tgactgtctt ggtgatgagg ccagtatggt 2708

ggcccttccc cgggcactaa ggaccacggt gctgcaaagg ccactcgggc atcctgatac 2768

tagcgggcat cctgttcagg aggcicaaca gctacaggag ctgaccctgg ttctgggggc 2828

ggatgcaagt ttgtgacat tctctactcc cctcattaa tgttgtcccc tgccctgctc 2888

cagcctgtcc tctgtggcct gggggctcgg cctgactaca ggtaaagcag agaggattct 2948

agagccaccc ttgtcatctt ctgagagtaa gggaccaggg cagcctttta agttctccat 3008

ctacatcccc agtgaccctg aggcaactca gctccagcct ggagtcggtg tttgtgctcc 3068

tatcttgacc ctggcagccc aggtctctgg gtccatcttc ctgcactgct cttaggaaaa 3128

gggtcctctt cccagctggt agcagcccca ggctttgggg ttcccccaa ctccctaacc 3188

caaaactacct tttgttgtt tgttttaacc tgaggccctt cttcacatct gacagttcct 3248

aagtcttggt ttggcttgct caaaaccac tgggtgcaag tgtcactcac tggctctctg 3308

ccaaacccaa cggtggtacg aggcggccat caaggctga gtgggtcaca gataccaact 3368

ctgacctctg agcctgcatg ggctttgcc ctgccctgtg gtctctcgcc ctgtagcaca 3428

gacagagact ctcatgccc tgggagttgt tgagtaaaat ctcttgccc agaagcacct 3488

atgtgggtcc actgtgtccc atctcacat tgtgttcttg ctcatitttg ccaagggcag 3548

gtcccttggg gcaggcgggg aacaactgca gagatttagt gattcatagg ttgtacagc 3608

gtttataact ttgcaaagca ctttattagc tcacagctgt ccactcacat gaaactcctg 3668

~~taggctctga gagaggctga gggtagcact catcttacct tcagatgaag cacaaggagg 3728~~

tcttattatc tgccccctgcc atccaggtgg ccttggtgg gtcttgtgtc cccatcagtg 3788

ggcccccca gggtccaaga aaactgtctc ttctagtcct ctctctggg cctcccccc 3848

ccagtcacct ggtccctctc ctgaggttgg tgcacactc ttgaaagctc taggccccgc 3908

aggctccctg ttggctcctg gcattccaag gccagttgcg aaagagcagg gcatggaggc 3968

aggcagccca ggctgcagat gtgagggaca cagggccggg cccagagagg gctcagccta 4028

gaggcttcca atcttgatt ctctgcctg cggtcactg ttgtccatc agcccaggtc 4088

agagcagtca gaggggcaaa gtactggagc cccagagct cagcttcccc tcggcctggg 4148

tgacatcaca gcattcagat gtcggtcaca ttttaaactg atcagccttt gtacaatgtt 4208

ttttaaata ttictaata aaacagaaat acagtgttaa aaaaaaaaaa aaaaa 4263

<210> 4

<211> 2620

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1935)

---

<400> 4

atg ccg agg agc cgg ggc ggc cgc gcc gcg ccg ggg ccg ccg ccg 48

Met Pro Arg Ser Arg Gly Gly Arg Ala Ala Pro Gly Pro Pro Pro Pro

1 5 10 15

ccg ccg ccg ccg ggc cag gcc ccg cgc tgg agc cgc tgg cgg gtc cct 96

Pro Pro Pro Pro Gly Gln Ala Pro Arg Trp Ser Arg Trp Arg Val Pro

20 25 30

ggg cgg ctg ctg ctg ctg ctg ctg ccc gcg ctc tgc tgc ctc ccg ggc 144  
Gly Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ala Leu Cys Cys Leu Pro Gly

35 40 45

gcc gcg cgg gcg gcg gcg gcg gcg gcg ggg gca ggg aac cgg gca gcg 192  
Ala Ala Arg Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Asn Arg Ala Ala

50 55 60

gtg gcg gtg gcg gtg gcg cgg gcg gac gag gcg gag gcg ccc ttc gcc 240  
Val Ala Val Ala Val Ala Arg Ala Asp Glu Ala Glu Ala Pro Phe Ala

65 70 75 80

ggg cag aac tgg tta aag tcc tat ggc tat ctg ctt ccc tat gac tca 288  
Gly Gln Asn Trp Leu Lys Ser Tyr Gly Tyr Leu Leu Pro Tyr Asp Ser

85 90 95

cgg gca tct gcg ctg cac tca gcg aag gcc ttg cag tcg gca gtc tcc 336  
Arg Ala Ser Ala Leu His Ser Ala Lys Ala Leu Gln Ser Ala Val Ser

100 105 110

~~act atg cag cag ttt tac ggg atc ccg gtc acc ggt gtg ttg gat cag 384~~

Thr Met Gln Gln Phe Tyr Gly Ile Pro Val Thr Gly Val Leu Asp Gln

115 120 125

aca acg atc gag tgg atg aag aaa ccc cga tgt ggt gtc cct gat cac 432  
Thr Thr Ile Glu Trp Met Lys Lys Pro Arg Cys Gly Val Pro Asp His

130 135 140



ccc cac tta agc cgt agg cgg aga aac aag cgc tat gcc ctg act gga 480

Pro His Leu Ser Arg Arg Arg Arg Asn Lys Arg Tyr Ala Leu Thr Gly

145 150 155 160

cag aag tgg agg caa aaa cac atc acc tac agc att cac aac tat acc 528

Gln Lys Trp Arg Gln Lys His Ile Thr Tyr Ser Ile His Asn Tyr Thr

165 170 175

cca aaa gtg ggt gag cta gac acg cgg aaa gct att cgc cag gct ttc 576

Pro Lys Val Gly Glu Leu Asp Thr Arg Lys Ala Ile Arg Gln Ala Phe

180 185 190

gat gtg tgg cag aag gtg acc cca ctg acc ttt gaa gag gtg cca tac 624

Asp Val Trp Gln Lys Val Thr Pro Leu Thr Phe Glu Glu Val Pro Tyr

195 200 205

cat gag atc aaa agt gac cgg aag gag gca gac atc atg atc ttt ttt 672

His Glu Ile Lys Ser Asp Arg Lys Glu Ala Asp Ile Met Ile Phe Phe

210 215 220

gct tct ggt ttc cat ggc gac agc tcc cca ttt gat gga gaa ggg gga 720

Ala Ser Gly Phe His Gly Asp Ser Ser Pro Phe Asp Gly Glu Gly Gly

225 230 235 240

ttc ctg gcc cat gcc tac ttc cct ggc cca ggg att gga gga gac acc 768

Phe Leu Ala His Ala Tyr Phe Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Thr

245 250 255

cac ttt gac tcc gat gag cca tgg acg cta gga aac gcc aac cat gac 816

His Phe Asp Ser Asp Glu Pro Trp Thr Leu Gly Asn Ala Asn His Asp  
260 265 270

ggg aac gac ctc ttc ctg gtg gct gtg cat gag ctg ggc cac gcg ctg 864  
Gly Asn Asp Leu Phe Leu Val Ala Val His Glu Leu Gly His Ala Leu  
275 280 285

gga ctg gag cac tcc agc gac ccc agc gcc atc atg gcg ccc ttc tac 912  
Gly Leu Glu His Ser Ser Asp Pro Ser Ala Ile Met Ala Pro Phe Tyr  
290 295 300

cag tac atg gag acg cac aac ttc aag ctg ccc cag gac gat ctc cag 960  
Gln Tyr Met Glu Thr His Asn Phe Lys Leu Pro Gln Asp Asp Leu Gln  
305 310 315 320

ggc atc cag aag atc tat gga ccc cca gcc gag cct ctg gag ccc aca 1008  
Gly Ile Gln Lys Ile Tyr Gly Pro Pro Ala Glu Pro Leu Glu Pro Thr  
325 330 335

agg cca ctc cct aca ctc ccc gtc cgc agg atc cac tca cca tcg gag 1056  
Arg Pro Leu Pro Thr Leu Pro Val Arg Arg Ile His Ser Pro Ser Glu  
340 345 350

agg aaa cac gag cgc cag ccc agg ccc cct cgg ccg ccc ctc ggg gac 1104  
Arg Lys His Glu Arg Gln Pro Arg Pro Pro Arg Pro Pro Leu Gly Asp  
355 360 365

cgg cca tcc aca cca ggc acc aaa ccc aac atc tgt gac ggc aac ttc 1152  
Arg Pro Ser Thr Pro Gly Thr Lys Pro Asn Ile Cys Asp Gly Asn Phe

370

375

380

aac aca gtg gcc ctc ttc cgg ggc gag atg ttt gtc ttt aag gat cgc 1200

Asn Thr Val Ala Leu Phe Arg Gly Glu Met Phe Val Phe Lys Asp Arg

385

390

395

400

tgg ttc tgg cgt ctg cgc aat aac cga gtg cag gag ggc tac ccc atg 1248

Trp Phe Trp Arg Leu Arg Asn Asn Arg Val Gln Glu Gly Tyr Pro Met

405

410

415

cag atc gag cag ttc tgg aag ggc ctg cct gcc cgc atc gac gca gcc 1296

Gln Ile Glu Gln Phe Trp Lys Gly Leu Pro Ala Arg Ile Asp Ala Ala

420

425

430

tat gaa agg gcc gat ggg aga ttt gtc ttc ttc aaa ggt gac aag tat 1344

Tyr Glu Arg Ala Asp Gly Arg Phe Val Phe Phe Lys Gly Asp Lys Tyr

435

440

445

tgg gtg ttt aag gag gtg acg gtg gag cct ggg tac ccc cac agc ctg 1392

Trp Val Phe Lys Glu Val Thr Val Glu Pro Gly Tyr Pro His Ser Leu

450

455

460

ggg gag ctg ggc agc tgt ttg ccc cgt gaa ggc att gac aca gct ctg 1440

Gly Glu Leu Gly Ser Cys Leu Pro Arg Glu Gly Ile Asp Thr Ala Leu

465

470

475

480

cgc tgg gaa cct gtg ggc aag acc tac ttt ttc aaa ggc gag cgg tac 1488

Arg Trp Glu Pro Val Gly Lys Thr Tyr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Tyr

485

490

495

tgg cgc tac agc gag gag cgg cgg gcc acg gac cct ggc tac cct aag 1536

Trp Arg Tyr Ser Glu Glu Arg Arg Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Pro Lys

500

505

510

ccc atc acc gtg tgg aag ggc atc cca cag gct ccc caa gga gcc ttc 1584

Pro Ile Thr Val Trp Lys Gly Ile Pro Gln Ala Pro Gln Gly Ala Phe

515

520

525

atc agc aag gaa gga tat tac acc tat ttc tac aag ggc cgg gac tac 1632

Ile Ser Lys Glu Gly Tyr Tyr Thr Tyr Phe Tyr Lys Gly Arg Asp Tyr

530

535

540

tgg aag ttt gac aac cag aaa ctg agc gtg gag cca ggc tac ccg cgc 1680

Trp Lys Phe Asp Asn Gln Lys Leu Ser Val Glu Pro Gly Tyr Pro Arg

545

550

555

560

aac atc ctg cgt gac tgg atg ggc tgc aac cag aag gag gtg gag cgg 1728

Asn Ile Leu Arg Asp Trp Met Gly Cys Asn Gln Lys Glu Val Glu Arg

565

570

575

~~cgg aag gag cgg cgg ctg ccc cag gac gac gtg gac atc atg gtg acc 1776~~

Arg Lys Glu Arg Arg Leu Pro Gln Asp Asp Val Asp Ile Met Val Thr

580

585

590

atc aac gat gtg ccg ggc tcc gtg aac gcc gtg gcc gtg gtc atc ccc 1824

Ile Asn Asp Val Pro Gly Ser Val Asn Ala Val Ala Val Val Ile Pro

595

600

605

tgc atc ctg tcc ctc tgc atc ctg gtg ctg gtc tac acc atc ttc cag 1872  
 Cys Ile Leu Ser Leu Cys Ile Leu Val Leu Val Tyr Thr Ile Phe Gln  
 610 615 620

ttc aag aac aag aca ggc cct cag cct gtc acc tac tat aag cgg cca 1920  
 Phe Lys Asn Lys Thr Gly Pro Gln Pro Val Thr Tyr Tyr Lys Arg Pro  
 625 630 635 640

gtc cag gaa tgg gtg tgagcagccc agagccctct ctatccactt ggtctggcca 1975  
 Val Gln Glu Trp Val  
 645

gccaggccct tcctcaccag ggtctgaggg gcagctctgg ccagtgtca ccagggccag 2035

cagggcccta ggctggggtc gtacagctga agttgtgggt gcattggcct aggctgagcg 2095

tggggcaggg aattatgggg gctgtgccca ggggtgggtgt ctggcaccca gctgccagcc 2155

ttctgtcctg ggcaaactac tcctactta agggaaatagg ccaggctcca tccggaggca 2215

gggaccatgc caggaggagc ccctgtgggt acggcatcct gtggtgtcca tgaggtagca 2275

cagctccact cctggctgga acccggcacc ctctgtggga agccagcact agctctcatc 2335

ccccatccgg gagataccac cagtcctggt ccccttttgc caacacctgc tggtcagatg 2395

tccccctacc cccacccac tgtcctccaa ggctacagga cccctgcttc tgacacagtg 2455

agcaacaagc ctgggtttcc ctgctggcag acggcagatc cctcaggaaa cctgctccac 2515

ttgtcagggt ctcttcggag acccaggatt tagggtcaca tgctgcaggc agggctgtgg 2575

cccagctggg tctgacaagg acccgtgtca catcgtgaat attta 2620

<210> 5

<211> 21

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 5

aatctcccat cggccctttc a 21

<210> 6

<211> 35

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 6

gtaggaattc gggttgtagg gaggtcgaca ttgcc 35

<210> 7

<211> 23

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 7

ggcaatgtcg acctccctac aac 23

<210> 8

<211> 20

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 8

atgcacggcc accaggaaga

20

<210> 9

<211> 23

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 9

ctccctacaa cccgaattcc tac

23

<210> 10

<211> 20

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 10

ggatcagaca acgatcgagt

20

<210> 11

<211> 20

<212> D N A

<213> Homo sapiens

<400> 11

cagcttgaag ttgtgcgtct

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ヒトMT5-MMPとマウスMT5-MMPのアミノ酸配列とヒトMT1-MMP、MT2-MMP、MT3-MMPならびにヒトMT4-MMPのアミノ酸配列を比較した図である。\*の部分は一致しているアミノ酸残基を示す。・の部分は類似しているアミノ酸残基を示す。（アミノ酸残基は一文字表記で示す。）

【符号の説明】

kb：キロ塩基対 (kilobase pairs)



## 【書類名】 図面

## 【図 1】

```

human NT1-MOP 1 ---NSPAP---RP-----SRCLLLPL-LTLGTAALSGSAQS-----SSFSPEANLQGYGLPPKD 49
human NT2-MOP 1 ---MGSDPSAPGRPGWT---CSLLGDREAAAPRLPL-LVLVLGCLGLGVAED-----AEVHAENLRLVGYLPPQS 67
human NT3-MOP 1 -MILLTFSTGRRLDFVH-----HSGVFFLOT-LWIIICATVCG-----TEQYFNVEWLGXYGYLPPPT 57
human NT4-MOP 1 MRRRAARGCPGP-PPGP-----GLSRLPLPLPLLLALLGTRGGCAAEPAE-RAEDLSLGVWLSRFGYLLPAD 69
human NT5-MOP 1 ---MPBSRGGAAPGPPPPPPPGQAPRWSRWRVPGRLLL-LPALCCLPGAARAAAAAGAGNRAAVAVARADEAEAPFAGQNWLSYGYLLPYD 95
mouse NT5-MOP 1 ---MPBSRGGAAPG-----QASRWGWRAPGRLLP-LPALCCLAAAGAGKAPAC-----ADAPFAGQNWLSYGYLLPYE 68
* * *

human NT1-MOP 50 LRHTQKSPQSLAAIAAQFYGLQVTKADATKAKRRPRCGVDPKGAELKANVR--KRYAIQGLKQWHEITFCIQNYT--PKVGEYATYEAIR 145
human NT2-MOP 68 RHMSTKRSQIILASALAEQRFYGIPTVGLDEETKEWQKPRCGVDPQGVRYKANLRRRRKRYALTGRKWNHHLTFSIQNYT--EXLQWYHSNEAVR 165
human NT3-MOP 58 PRMSVLSRAETMQSALAAWQFYGINMTGKVDNTIDWQKPRCGVDPQTRGSSKFIIR--KRYALTGQKQWHEITYSIKNYT--PKVGDPETRKAI 153
human NT4-MOP 70 PTTGQLQTQEELSKAITAQFGGLEATGILDEATLALMGTPRCSLPDLPVLTQ--ARR--RRQAPAPTNNKRLSNRVRTFPDPSLGHDTBALMY 164
human NT5-MOP 96 SRASALHSKALQSAVSTNQFYGIPTVGLDQTTIEWQKPRCGVDPHPLSR--RRRN--KRYALTGQKQWHEITYSIHNYT--PKVGELDTKAI 189
mouse NT5-MOP 69 SRASALHSKALQSAVSTNQFYGIPTVGLDQTTIEWQKPRCGVDPHPLSR--RRRN--KRYALTGQKQWHEITYSIHNYT--PKVGELDTKAI 162
* * *

human NT1-MOP 146 KAFRVWESATPLRFREVPYAIIEGHEKQADINIFFAEGFHGDSPTDGEGLAHAYFPGPN-IGGOTHFDSAEPTVTRNEDLNGDILFLVAVHELGA 244
human NT2-MOP 166 KAFRVWESATPLRFREVPYAIIEGHEKQADINIFFAEGFHGDSPTDGEGLAHAYFPGPN-IGGOTHFDSAEPTVTRNEDLNGDILFLVAVHELGA 264
human NT3-MOP 154 KAFRVWESATPLRFREVPYAIIEGHEKQADINIFFAEGFHGDSPTDGEGLAHAYFPGPN-IGGOTHFDSAEPTVTRNEDLNGDILFLVAVHELGA 251
human NT4-MOP 165 YALKVRSDIAPLNFHEV---AGS-TADIQIDFSKADHMDGYPFDARR-HRAHAFFPGHHTAGYTHFNDEAWTFRSSDAHQDLFAVAVHELGA 255
human NT5-MOP 190 QAFDVWQKVTPLTFEEVPPYHEIKSDR-KEADINIFFAEGFHGDSPTDGEGLAHAYFPGPN-IGGOTHFDSAEPTVTRNEDLNGDILFLVAVHELGA 287
mouse NT5-MOP 163 QAFDVWQKVTPLTFEEVPPYHEIKSDR-KEADINIFFAEGFHGDSPTDGEGLAHAYFPGPN-IGGOTHFDSAEPTVTRNEDLNGDILFLVAVHELGA 260
* * *

human NT1-MOP 245 LGLEHSSDPSAIKAPFYQWDETE-NFVLPPDDRRGIQQLYGGESG-----FPTKNPQP-----RTTSRPSVPQKPNP----- 312
human NT2-MOP 265 LGLEHSSDPSAIKAPFYQWDETE-NFVLPPDDRRGIQQLYGGESG-----FPTKNPQP-----RPHDRPPRPPQPPPGGKPERPPKGPVPVQR 357
human NT3-MOP 252 LGLEHSDPTAIKAPFYQWDETE-NFVLPPDDRRGIQQLYGGESG-----FPTKNPQP-----PPDNRSSAPPRKD----- 329
human NT4-MOP 256 LGLEHSDPTAIKAPFYQWDETE-NFVLPPDDRRGIQQLYGGESG-----FPTKNPQP-----PPDNRSSAPPRKD----- 329
human NT5-MOP 288 LGLEHSSDPSAIKAPFYQWDETE-NFVLPPDDRRGIQQLYGGESG-----FPTKNPQP-----PPDNRSSAPPRKD----- 368
mouse NT5-MOP 261 LGLEHSDPSAIKAPFYQWDETE-NFVLPPDDRRGIQQLYGGESG-----FPTKNPQP-----PPDNRSSAPPRKD----- 341
* * *

human NT1-MOP 313 ---TYGPNICDGNFTVALRGEMFVFKRWFWRVRRNQ-VMDGYPMQIQGFWRGLP---ASINTAYER-KDGFVFFKGDYVDEASLEPGYK 401
human NT2-MOP 358 ATERPDQYGPNICDGNFTVALRGEMFVFKRWFWRVRRNQ-VMDGYPMQIQGFWRGLP---ASINTAYER-KDGFVFFKGDYVDEASLEPGYK 452
human NT3-MOP 332 -RPSYPGAKPNICDGNFTVALRGEMFVFKRWFWRVRRNQ-VMDGYPMQIQGFWRGLP---PSIDAVYEN-SDGNFVFFKGDYVDEASLEPGYK 425
human NT4-MOP 330 ---VPERCSTHFDVAQIRGEAFFKGYFWRLTRDHLVSLQPAQNHFRFWRGLPJLHDSVDAYERTSDHIVFFKGDYVDEASLEPGYK 421
human NT5-MOP 369 -RPSTPGTAPNICDGNFTVALRGEMFVFKRWFWRVRRNQ-VMDGYPMQIQGFWRGLP---ARIDAYER-ADGRFVFFKGDYVDEASLEPGYK 462
mouse NT5-MOP 342 -RPSTPGTAPNICDGNFTVALRGEMFVFKRWFWRVRRNQ-VMDGYPMQIQGFWRGLP---ARIDAYER-ADGRFVFFKGDYVDEASLEPGYK 435
* * *

human NT1-MOP 402 HIKELGRGLPTDKIDAALFMPNKTYYFRCKNYRFXNEELRAVDSEYPENIKVWEGIPESPRGSMGSEVFTYFKGNYKFNKGLAVEPGYKSA 501
human NT2-MOP 453 PLTSYGLGIPYDRIIDTAIWEPTGHTFFQEDRYNRFEETQRDGPYKPIVWQGI PASPGAFSLNDAAYTYFKGNYKFNKGLAVEPGYKSA 552
human NT3-MOP 426 DLITLGSGLPPIHGIIDSAIWEPTGHTFFQEDRYNRFEETQRDGPYKPIVWQGI PASPGAFSLNDAAYTYFKGNYKFNKGLAVEPGYKSA 525
human NT4-MOP 422 PVSDPS--LPPGGIDAASRAHNRXYFFKQDLYWRVDDHTRDGPYKPIVWQGI PASPGAFSLNDAAYTYFKGNYKFNKGLAVEPGYKSA 518
human NT5-MOP 463 SLGELGSCLPREGIDTALRWEVGTYYFFKGERYWCYSEERRATDGPYKPIVWQGI PASPGAFSLNDAAYTYFKGNYKFNKGLAVEPGYKSA 562
mouse NT5-MOP 436 SLGELGSCLPREGIDTALRWEVGTYYFFKGERYWCYSEERRATDGPYKPIVWQGI PASPGAFSLNDAAYTYFKGNYKFNKGLAVEPGYKSA 535
* * *

human NT1-MOP 502 LRDNMGCPSGGRPDE-----GTEETEVIIEVDE-----EGGG-----AVSAAYVLPVLLLVAVGLAVFFFRH 565
human NT2-MOP 553 LRDNMGCPSGGRPDE-----GTEETEVIIEVDE-----EGGG-----AVSAAYVLPVLLLVAVGLAVFFFRH 652
human NT3-MOP 526 LRDNMGCPSGGRPDE-----GTEETEVIIEVDE-----EGGG-----AVSAAYVLPVLLLVAVGLAVFFFRH 590
human NT4-MOP 519 LRDNMGCPSGGRPDE-----GTEETEVIIEVDE-----EGGG-----AVSAAYVLPVLLLVAVGLAVFFFRH 590
human NT5-MOP 563 LRDNMGCPSGGRPDE-----GTEETEVIIEVDE-----EGGG-----AVSAAYVLPVLLLVAVGLAVFFFRH 628
mouse NT5-MOP 536 LRDNMGCPSGGRPDE-----GTEETEVIIEVDE-----EGGG-----AVSAAYVLPVLLLVAVGLAVFFFRH 601
* * *

human NT1-MOP 566 GTPRRLLYCQRLSLDKV 582
human NT2-MOP 653 GTPRRLLYCQRLSLDKV 669
human NT3-MOP 591 GTPRRLLYCQRLSLDKV 607
human NT4-MOP 591 LSPGALVTAQAALTL-- 605
human NT5-MOP 629 TGQPVVYYKRPVQENV 645
mouse NT5-MOP 602 AGQPVVYYKRPVQENV 618

```

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼポリペプチドの提供。

【解決手段】 以下の(a)、(b)、(c)または(d)のポリペプチド。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(b) (a)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつメタロプロテアーゼ活性を有するポリペプチド

(c) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド

(d) (c)のポリペプチドの有するアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつプロテアーゼ活性を有するポリペプチド

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】  
 【識別番号】 598133126  
 【住所又は居所】 東京都港区白金台4-6-1  
 【氏名又は名称】 清水 元治  
 【代理人】 申請人  
 【識別番号】 100091096  
 【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所  
 【氏名又は名称】 平木 祐輔  
 【選任した代理人】  
 【識別番号】 100096183  
 【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所  
 【氏名又は名称】 石井 貞次

【書類名】 手続補正書  
 【整理番号】 H10-1324N2  
 【提出日】 平成10年10月29日  
 【あて先】 特許庁長官 殿  
 【事件の表示】  
     【出願番号】 平成10年特許願第276258号

【補正をする者】  
     【事件との関係】 特許出願人  
     【識別番号】 598133126  
     【氏名又は名称】 清水 元治

【代理人】  
     【識別番号】 100091096  
     【弁理士】  
     【氏名又は名称】 平木 祐輔

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願  
 【補正対象項目名】 発明者  
 【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】  
     【住所又は居所】 東京都品川区小山台2-5, 5-203

【氏名】 清水 元治

【手続補正 2】

【補正対象書類名】 特許願  
 【補正対象項目名】 特許出願人  
 【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許出願人】  
     【住所又は居所】 東京都品川区小山台2-5, 5-203

【氏名又は名称】 清木 元治

【手続補正 3】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 委任状

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 委任状 1

【手続補正 4】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 受託証

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 受託証（写し） 2

\*\*\*

【手続補正 4】

【物件名】 誤記理由書 1

19820600135



# 委任状

平成 10 年 10 月 15 日

私は、識別番号 100091096 弁理士 平 木 祐 輔 氏を以って  
100096183 石 井 貞 次

代理人として下記事項を委任します。

記

## 1. 特 許 出 願



に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更、拒絶査定不服及び補正却下の決定に対する審判の請求並びに取下げ。

2. 上記出願又は 平成 年 願 号

に基づく「特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の」優先権主張並びにその取下げ。

3. 上記出願の分割出願及び補正却下の決定に対する新たな出願に関する一切の件並びに本件に関する上記事項一切。

4. 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、実用新案技術評価の請求、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の下附を受けること。

5. 上記出願に係る特許に対する特許異議の中立て又は商標（防護商標）登録に対する登録異議の申立てに関する手続。

6. 第1項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対する答弁、取下其他本件に関する提出書類及び物件の下附を受けること。

7. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続を為すこと。

8. 上記事項を処理する為、復代理人を選任及び解任すること。

住 所 〒142-0061 東京都品川区小山 2-5, 1-203

氏 名 清 木 元 治





国際様式 INTERNATIONAL FORM

[ 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約 ]

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い  
発行される。

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

19820600135



氏名 (名称) 協和発酵工業株式会社  
取締役社長 平田 正 殿

寄託者 あて名 〒 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Escherichia coli mouse pmMT5/pBSSK	(受託番号) FERM BP- 6529
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1株の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。  <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成10年 9月25日(原寄託日)に受領した1株の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日(原寄託日)に1株の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所</p> <p>名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology</p> <p>所長 大前 恒夫 博士 Dr. Shiro Maki Director-General</p> <p>あて名: 日本国茨城県つくば市1-3-1 (郵便番号305-8566) 1-3, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN</p> <p>平成10年(1998) 9月25日</p>	

国際様式 INTERNATIONAL FORM



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される。

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 協和隆興工業株式会社  
取締役社長 平田 正 殿  
寄託者 あて名 〒 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した鑑別のための表示) Escherichia coli pHMT5/pGEM	(受託番号) FERM BP-6531
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1種の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成10年 9月25日(原寄託日)に受領した1種の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、年 月 日(原寄託日)に1種の微生物を受領した。 そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所</p> <p>National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology</p> <p>名称: 所長 大賀 信 Dr. Shin Ohgaki, Director-General</p> <p>あて名: 日本国茨城県つくば市 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN (郵便番号 305-8566)</p> <p>平成10年(1998) 9月25日</p>	



19820600135



## 誤記理由書

平成10年9月29日付で提出致しました、本特許願（特願平10-276258号）の願書の発明者及び特許出願人の住所表記について、出願時の連絡ミスにより誤記していることが判明致しました。

よって、本特許願の発明者及び特許出願人の欄を正しく表記すべく、同書を添えて発明者及び特許出願人の欄を補正する手続補正書を提出致しますので、何卒宜しくお願い申し上げます。

代理人 弁理士 平 木 祐 輔



【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 手続補正書

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】 598133126

【住所又は居所】 東京都港区白金台4-6-1

【氏名又は名称】 清水 元治

【代理人】 申請人

【識別番号】 100091096

【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

受託証（写し） 1

誤記理由書 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [598133126]

1. 変更年月日 1998年 9月29日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都港区白金台4-6-1  
氏 名 清水 元治
2. 変更年月日 1998年12月24日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 東京都品川区小山台2-5, 5-203  
氏 名 清水 元治

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**